

*М. Х. САЯТОВ, К. Х. ЖУМАТОВ, А. И. КЫДЫРМАНОВ, К. О. КАРАМЕНДИН,
Н. Г. ИШМУХАМЕТОВА, С. Е. АСАНОВА, К. Д. ДАУЛБАЕВА*

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ ПОВЕРХНОСТНЫХ И ВНУТРЕННИХ БЕЛКОВ ВИРУСОВ ГРИППА А, ПОДТИПОВ Н3N6 И Н3N8, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДИКИХ ПТИЦ В РЕСПУБЛИКЕ КАЗАХСТАН

Институт микробиологии и вирусологии МОН РК, г. Алматы

Представлены результаты филогенетического анализа генов белков НА, NP, М и NS вирусов гриппа А, подтипов H3N6 и H3N8 изолированных от диких птиц на территории Республики Казахстан в 2006–2008 гг. Показано генетическое многообразие казахстанских изолятов и их взаимоотношения с вирусами гриппа подтипа H3 из международной базы данных GenBank.

Введение. Возбудители гриппа относятся к представителям трех родов семейства Orthomyxoviridae (A, B и C), из которых вирусы серотипа A представляют наибольшую опасность для здоровья человека. В прошлом веке они явились причиной опустошительной пандемии 1918 г., унесшей жизни более 40 млн людей по всему миру, а также пандемий 1957 и 1968 гг., вызвавших гибель сотен тысяч человек [1].

Глобальное и неконтролируемое распространение гриппозной инфекции объясняется, прежде всего, уникальной вариабельностью возбудителя, в основе которой лежат как точковые мутации, характерные для РНК-содержащих

вирусов, так и рекомбинации и реассортации генов. При этом наиболее изменчивыми структурными компонентами вирусной частицы являются поверхность антигены - гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА). Подтиповая принадлежность всех выделенных на сегодня вирусов гриппа А определяется сочетанием 16 известных подтипов НА и 9 подтипов НА - H1N1, H3N2, H5N1, H7N7 и др. [2, 3].

Другой отличительной чертой вирусов гриппа А служит необычайно широкий круг хозяев, включающий, помимо человека, свыше 90 видов птиц и различных млекопитающих, таких как свиньи, лошади, норки, ондатры, дикие кошачьи, собаки и морские животные [4-8].

Естественный резервуар возбудителей гриппа находится в дикой орнитофауне, преимущественно в популяциях мигрирующих видов водного и околоводного комплексов. В случае преодоления видового барьера между птицами и млекопитающими животными вирус гриппа А, после первоначальной адаптации в течение довольно длительного периода, может приобрести способность инфицировать новый вид, и в дальнейшем циркулировать в этой экологической нише многие десятилетия уже как эндемичный возбудитель. К таким эндемичным инфекциям на сегодняшний день можно отнести грипп свиней, лошадей, большинство случаев гриппа человека и грипп собак [9].

Вирусы гриппа подтипа H3 занимают особое место в ряду возбудителей данной инфекции, так как они относятся к одному из трех вариантов, вызвавших пандемии в 20 веке. Помимо этого, они постоянно циркулируют в человеческой популяции и ежегодно вызывают сезонные эпидемии у населения. В связи с вышеизложенным представляет интерес сравнительное филогенетическое исследование вирусов гриппа A/H3, выделенных от диких птиц в различных регионах Казахстана с другими, ранее изолированными вирусами этого подтипа.

Материалы и методы

Вирусы. Четыре изолята вируса гриппа А с подтиром НА H3 - A/чирок-трескунок/Коргалжын/865/04, A/чирок-свиристунок/Коргалжын/1797/06, A/серый гусь/Коргалжын/1867/06, A/чирок-свиристунок/ЮКО/8048/08), выделенные от водопла-вающих птиц в Центральном и Южном Казахстане, клонировали и пассировали методом предельных разведений на 10-11-дневных развивающихся куриных эмбрионах по общепринятой методике.

Выделение РНК проводили с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen GmbH, Hidden) в соответствии с рекомендациями производителя.

Комплементарные ДНК из РНК получали методом обратной транскрипции при помощи универсального праймера uni-12 для вирусов гриппа А из набора First Strand cDNA Synthesis kit (Fermentas) согласно наставлений производителя.

Секвенирование ДНК проводили в Национальной лаборатории биотехнологии коллективного

использования РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК с использованием терминирующих дидеоксинуклеотидов на автоматическом 96-канальном секвенаторе ABI 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems).

Выравнивание секвенированных последовательностей генов вирусов гриппа А с полными нуклеотидными последовательностями таковых из международной базы данных проводили с помощью компьютерной программы BioEdit.

Филогенетический анализ и построение древ выполнены с помощью программ BioEdit и MEGA версии 4 методом «присоединение соседей» со значениями Bootstrap на основе 1000 повторов с использованием последовательностей из GeneBank [10].

Результаты и обсуждение

После секвенирования ДНК-копий фрагментов генов M, NP, NS и НА казахстанских изолятов проведено их выравнивание с соответствующими нуклеотидными последовательностями вирусов этого подтипа из международного банка «GenBank». Размер сегментов генов M, NP, NS и НА изолятов вируса гриппа А/чирок-трескунок/Коргалжын/865/04, A/серый гусь/Коргалжын/1867/06, A/чирок-свиристунок/Коргалжын/1797/06 и A/чирок-свиристунок/ЮКО/8048/08, а также номера их депонентов в международном банке генетической информации GenBank приведены в таблице.

Характеристика сегментов генов и номера доступа в «GenBank» к казахстанским изолятам вируса гриппа с гемагглютинином H3

Изолят (русское и английское название)	Ген	Размер (пар нуклеотидов)	Генбанк №
A/чирок-трескунок/Коргалжын/865/04 (H3N6) [A/garganey/Korgalzhyn/865/04 (H3N6)]	M NP NS HA	930 853 863 1605	GU953255 GU953256 FJ434368 GU953258
A/серый гусь/Коргалжын/1867/06 (H3N6) [A/graylag goose/Korgalzhyn/1867/06 (H3N6)]	M NP NS	700 649 852	GU953249 GU953250 GU953251
A/чирок-свиристунок/Коргалжын/1797/06 (H3N8) [A/teal/Korgalzhyn/1797/06 (H3N8)]	M NP NS HA	932 822 851 1573	GU953259 GU953260 GU953261 GU953262
A/чирок-свиристунок/ЮКО/8048/08 (H3N8) [A/teal/South Kazakhstan/8048/08 (H3N8)]	M NP NS	948 869 846	GU953252 GU953253 GU953254

Филогенетические дрэва, построенные на основе гомологии нуклеотидных последовательностей участков генов казахстанских изолятов с аналогичными сегментами вирусов гриппа подтипа H3 из международной базы данных GenBank, представлены на рис. 1-4.

Из рис. 1 видно, что по гену НА штаммы вируса гриппа подтипа H3 четко разделяются на 2 линии – американскую и евразийскую. Вирусы, формирующие евразийскую линию, далее разделяются на азиатскую и европейскую группы. В состав азиатской группы, кроме вирусов,

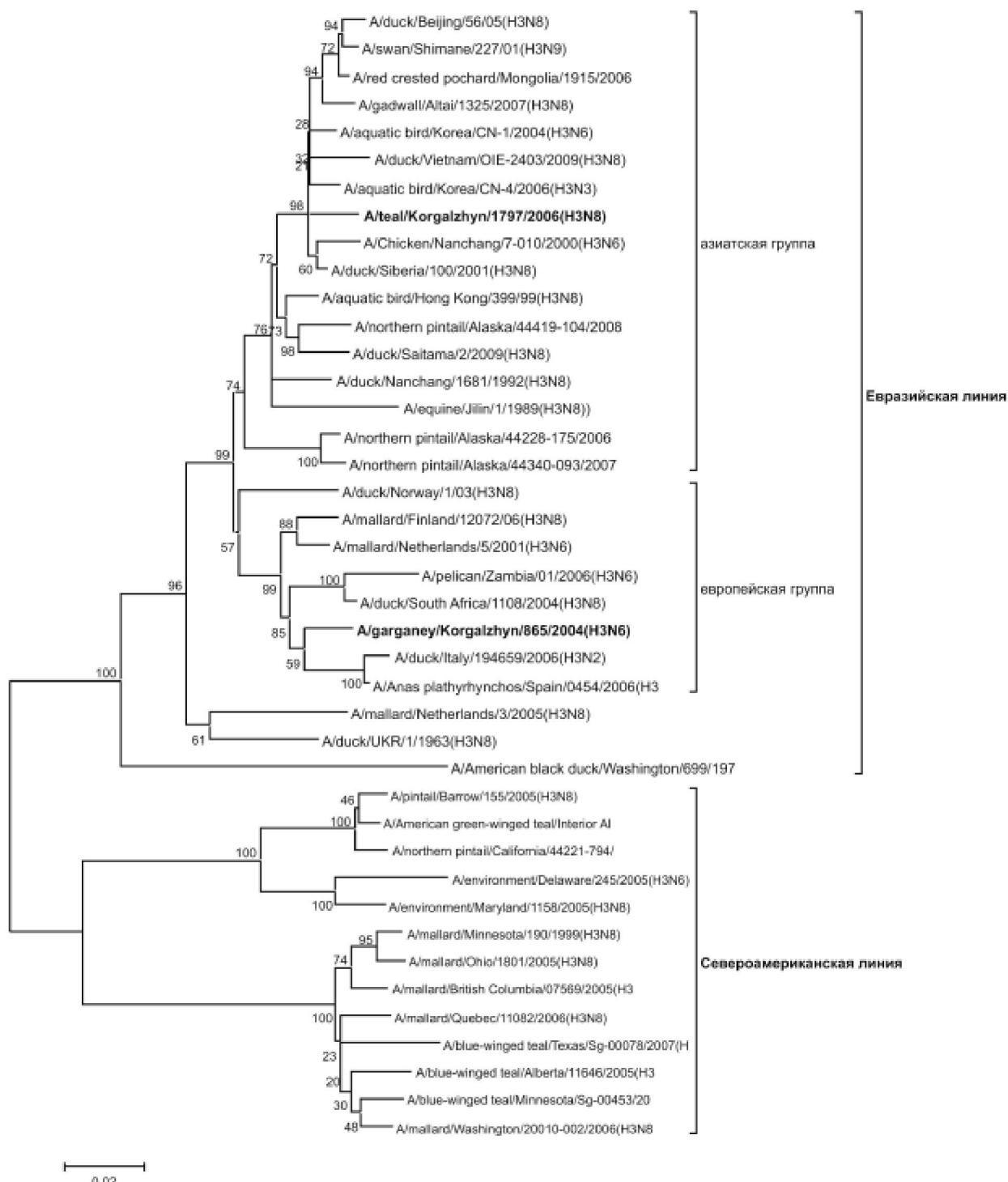


Рис. 1. Филогенетические взаимоотношения между генами НА казахстанских изолятов вируса гриппа A/H3 и вирусов этого подтипа из GenBank

циркулировавших на данном материке, также входят изоляты из Аляски.

Европейская группа объединяет вирусы гриппа перелетных птиц из Европы и Африки. По последовательности гена НА изолят A/чирок-трескунок/Коргалжын/865/04 (H3N6) проявил высокую степень идентичности с вирусами A/mallard/Netherlands/05/2001 (H3N6), A/mallard/Finland/12072/2006 (H3N8), которые образуют группу на одной ветви филогенетического дерева. Наряду с штаммами A/duck/South Africa/1108/2004 (H3N8), A/duck/Italy/194659/2006 (H3N2), A/Anas platyrhynchos/Spain/0454/2006 (H3), A/Pelican/Zambia/01/2006 (H3N6) он формирует отдельную подгруппу в составе европейской группы евразийской

линии. Ген НА другого казахстанского изолятта A/чирок-свиристунок/Коргалжын/1797/06 (H3N8) занимает отдельную ветвь филогенетического дерева и относится к азиатской группе евразийской линии вирусов гриппа. Для него наиболее близкими являются вирусы A/aquatic bird/Korea/CN-1/2004 (H3N6), A/aquatic bird/Korea/CN-4/2004 (H3N6), A/duck/Vietnam/OIE-2403/2009 (H3N9), выделенные от водоплавающих птиц.

Результаты анализа филогенетических взаимоотношений NP генов казахстанских изолятов вируса гриппа A/H3 с некоторыми вирусами данного подтипа, циркулировавшими среди диких птиц в различных регионах мира, отражены в виде дендрограммы на рис. 2.

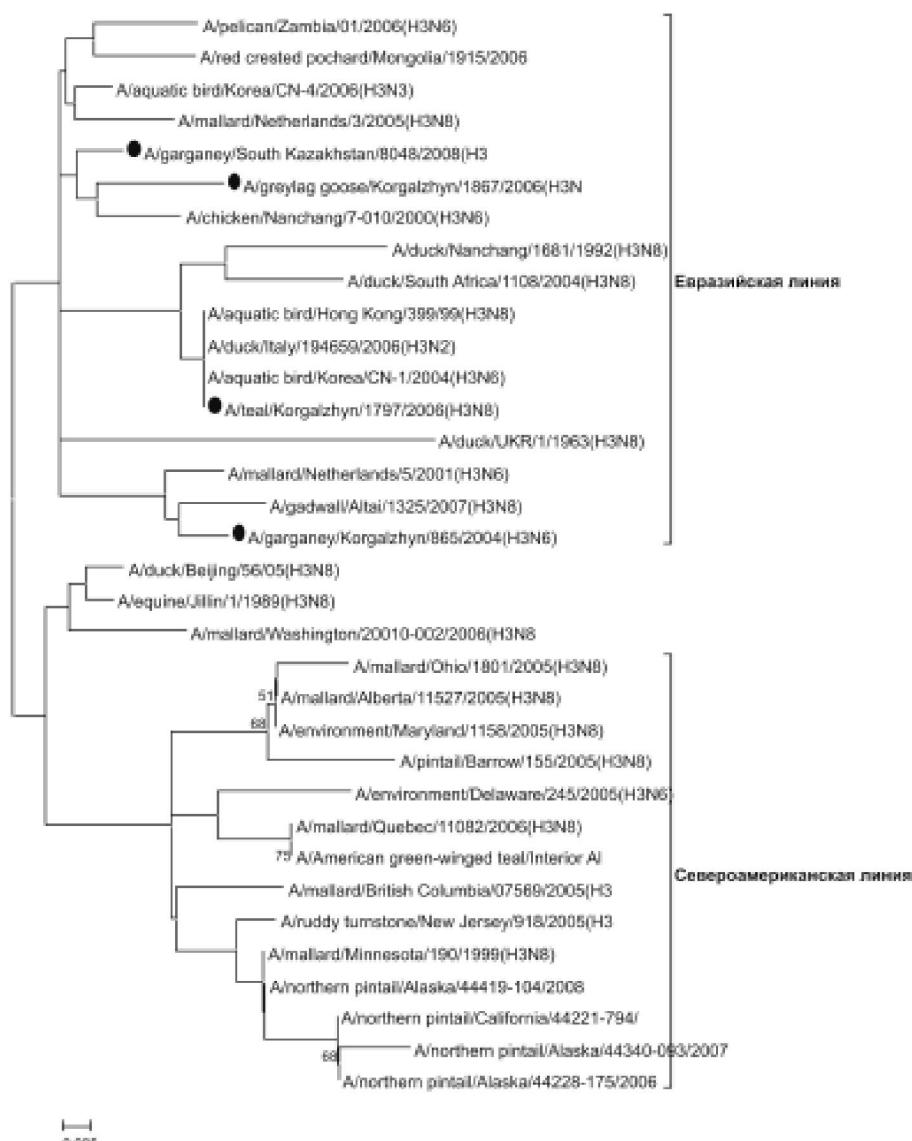


Рис. 2. Филогенетические взаимоотношения
между NP генами казахстанских изолятов вируса гриппа A/H3 и вирусов подтипа H3 из GenBank

Из рис. 2 видно, что вирусы, выделенные от утиных, по филогенетическому признаку входят в евразийскую линию. По различию NP генов изоляты A/чирок-трескунок/Коргалжын/865/04, A/серый гусь/Коргалжын/1867/06, A/чирок-свищунок/ЮКО/8048/06 характеризуются как тусообразной филогенией, которая характерна для консервативных генов вирусов. Вирусы A/серый гусь/Коргалжын/1867/06 и A/chiken/Nanchang/7-010/2000 (H3N6) по NP гену образуют отдельный кластер. От их внутренней ветви параллельно отпочковываются наиболее близкие по данному гену вирусы A/чирок-свищунок/ЮКО/8048/06 (H3N8) и A/pochard/Mongolia/1915/2006 (H3N6). Изолят A/чирок-трескунок/Коргалжын/865/04 (H3N6) проявил родство со штаммом A/gadwall/Altai/1325/2007 (H3N8). В свою очередь, изолят A/чирок-свищунок/Коргалжын/1797/06 оказался близок с штаммами A/aquatic bird/Korea/CN-1/2004 (H3N6), A/aquatic bird/Hon Kong/399/99 (H3N8) и A/duck/Italy/194659/2006 (H3N2), с которыми образует отдельный кластер.

Филогенетический анализ M гена казахстанских изолятов вируса гриппа H3N6 и H3N8 показал, что изолят A/чирок-свищунок/Коргалжын/1797/06 (H3N8) проявляет родство с A/duck/Nanchang/1681/1992 (H3N8) и формирует отдельный кластер, к которому относятся вирусы, циркулировавшие в основном в Азии (рис. 3).

Вирус A/чирок-трескунок/Коргалжын/865/04 (H3N6) внутри этой группы образовал отдельную ветвь с высокой степенью гомологии со штаммом A/Pelican/Zambia/01/2006 (H3N6). Вирус A/серый гусь/Коргалжын/1867/06 (H3N6) вместе с европейскими изолятами A/duck/Italy/194659/2006 (H3N2) и A/mallard/Netherlands/3/2005 (H3N8) отпочковывается от внутреннего узла ветви указанной группы. В филогенетическом отношении M ген изолята A/чирок-свищунок/ЮКО/8048/06 (H3N8) образует отдельную линию среди евразийских вирусов гриппа подтипа H3.

Результаты филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей NS гена казахстанских изолятов вирусов гриппа H3N6 и H3N8 и вирусов данного подтипа, циркулировавших среди диких птиц в разных регионах земного шара, отражены в виде дендрограммы на рис. 4.

Как видно из рис. 4, вирусы гриппа A/H3 разделяются на две четко отличающиеся друг от

друга группы, которые соответствуют подтипам A и B (аллелям) NS гена вируса гриппа A. Далее подтипы разделяются на американскую и евразийскую подгруппы.

Согласно дендрограмме филогенетических взаимосвязей, два казахстанских штамма вируса гриппа A с антигенной формулой H3N6 (A/чирок-свищунок/Коргалжын/1797/06 и A/чирок-свищунок/ЮКО/8048/08) принадлежали к аллели A, тогда как оставшиеся два изолята (A/речная крачка/Коргалжын/867/04 и A/серый гусь/Коргалжын/1867/06) отнесены к аллели B. Вирус A/чирок-свищунок/Коргалжын/1797/06 (H3N8) проявил родство по NS гену с A/duck/Nanchang/1681/1992 (H3N8). Изолят A/чирок-свищунок/ЮКО/8048/08 занимал отдельную ветвь в аллели A среди афро-евразийских вирусов.

Вирус A/серый гусь/Коргалжын/1867/06 (H3N6) по NS гену, также как и гену M, оказался близким к A/duck/Italy/194659/2006 (H3N2). Изолят A/речная крачка/Коргалжын/867/04 (H3N6) вместе с возбудителями гриппа, циркулировавшими в Корее и Монголии, формируют отдельную ветвь в аллели B азиатских вирусов.

В целом, филогенетический анализ HA, NP, M и NS генов казахстанских изолятов вируса гриппа с подтипом H3 N3 указывает на гетерогенность их популяции. Так, установлено, что по гену HA изолят A/чирок-трескунок/Коргалжын/865/04 (H3N6) сходен с вирусом A/mallard/Netherlands/05/2001 (H3N6) и по результатам филогенетического анализа входит в кластер европейских штаммов. В отличие от него, изолят A/чирок-свищунок/Коргалжын/1797/06 (H3N8) проявил высокую степень родства со штаммом A/aquatic bird/Korea/CN-1/2004 (H3N6), и по этому гену включен в кластер азиатских вирусов внутри евразийской линии. По NP гену вирус A/чирок-свищунок/Коргалжын/1797/06 (H3N8) отнесен к отдельному кластеру, в отличие от изолятов A/чирок-трескунок/Коргалжын/865/04 (H3N6), A/серый гусь/Коргалжын/1867/06 (H3N6), выделенных вместе с ним в одной местности и в одно и то же время.

Выявлена высокая степень филогенетического родства изолятов из Центрального Казахстана по M гену и их отличие от вируса A/чирок-свищунок/ЮКО/8048/08.

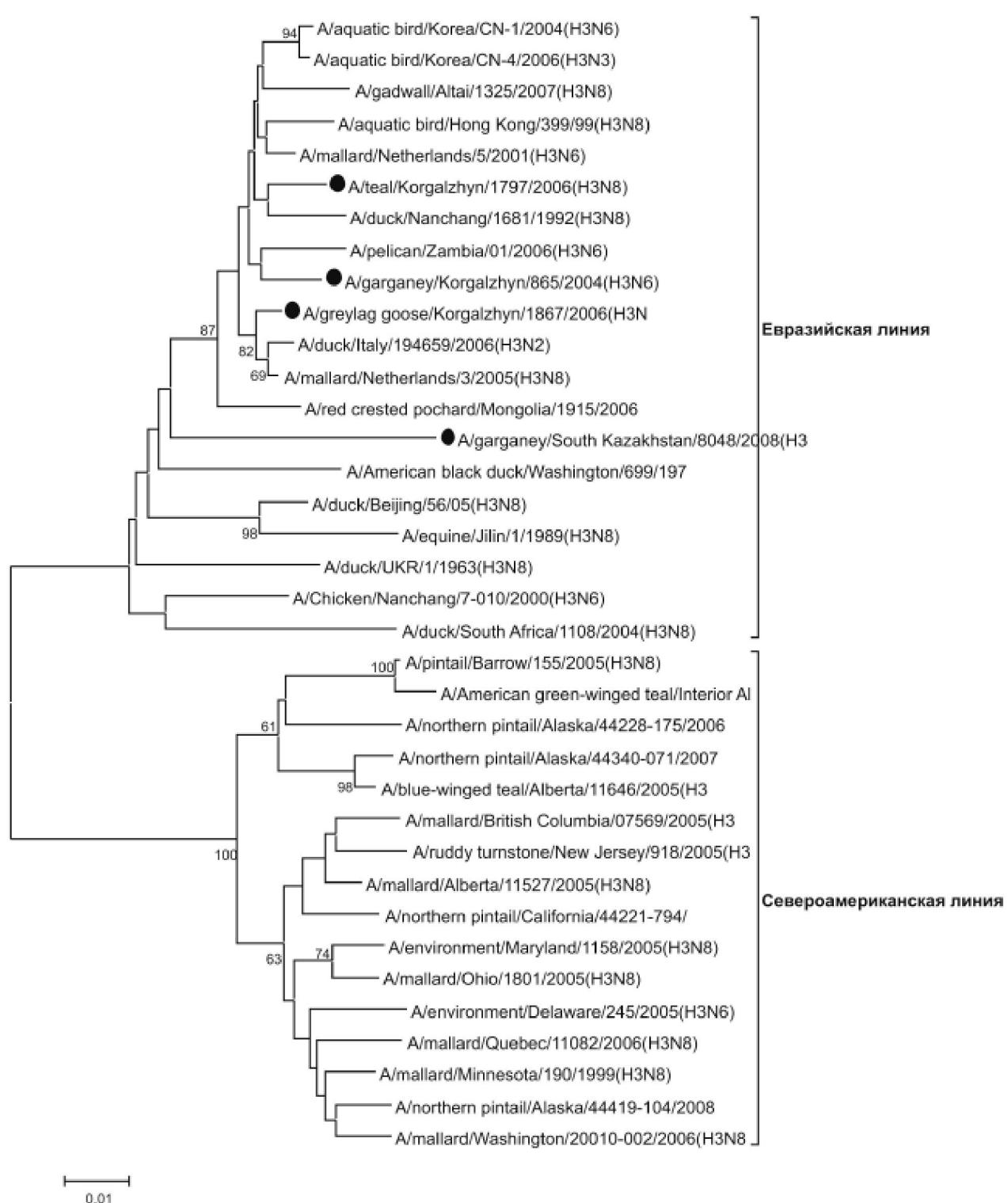


Рис. 3. Филогенетические взаимоотношения между М генами казахстанских изолятов вируса гриппа А/H3 и вирусов этого подтипа из GenBank

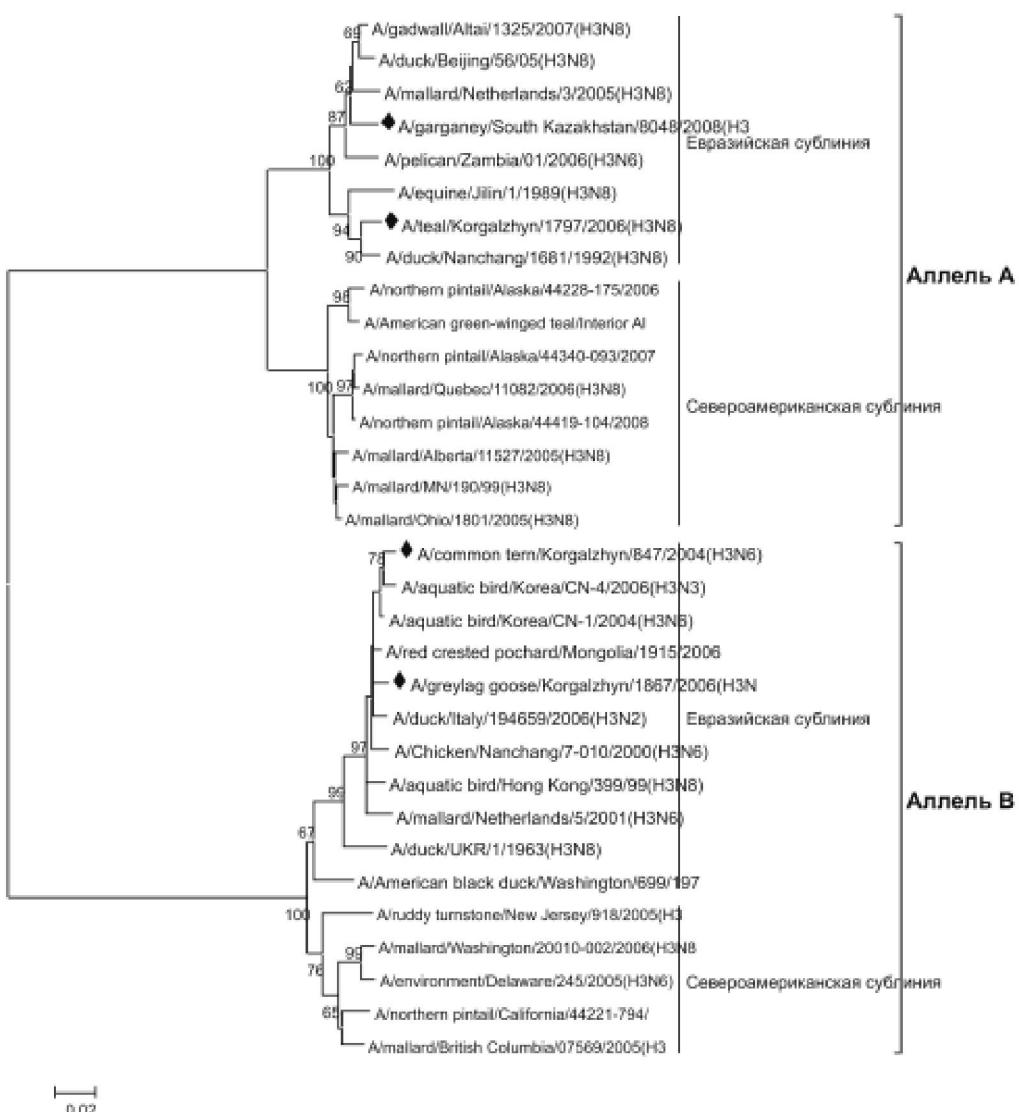


Рис. 4. Филогенетические взаимоотношения между NS генами казахстанских изолятов вируса гриппа A/H3 и вирусов этого подтипа из GenBank

По последовательности нуклеотидов NS гена изоляты A/чирок-свистунок/Коргалжын/1797/06, A/чирок-свистунок/ЮКО/8048/08 значительно отличались от A/речная крачка/Коргалжын/867/04 и A/серый гусь/Коргалжын/1867/06, и были отнесены к генетическим аллелям А и В, соответственно.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что вирусы гриппа подтипа H3 продолжают оставаться одними из самых распространенных и быстро изменяющихся возбудителей гриппозной инфекции. Полученные данные подтверждают важную роль проходящих через территорию Казахстана миграционных путей птиц в эволюции вируса гриппа А.

ЛИТЕРАТУРА

1. Reid A.H., Taubenberger J.K. The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma // *J Gen Virol.* 2003. V. 84. P. 2285-2292.
2. Cox N.J., Fuller F., Kaverin N., et al. Virus Taxonomy // Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press. San Diego, 2000. 1024 pp.
3. Fouchier R.A., Munster V., Wallensten A., et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls // *J Virol.* 2005. V. 79. P. 2814-2822.
4. Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., et al. Evolution and ecology of influenza A viruses // *Microbiol. Rev.* 1992. V. 56. P. 152-179.
5. Horimoto T., Kawaoka Y. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents // *Nature Reviews Microbiology.* 2005. V. 3, № 8. P. 591-600.

6. Keawcharoen J., Oraveerakul K., Kuiken T., et al. Avian influenza H5N1 in tigers and leopards // *Emerg Infect Dis.* 2004. V. 10. P. 2189-2191.
7. Yoon K.J., Cooper V.L., Schwartz K.J., et al. Influenza virus infection in racing greyhounds // *Emerg Infect Dis.* 2005. V. 11. P. 1974-1976.
8. Львов Д.К., Забережный А.Д., Алипер Т.И. Вирусы гриппа: события и прогнозы // *Природа.* 2006. № 6. С. 3-13.
9. Swayne D.E. Epidemiology of avian influenza in agricultural and other man-made systems // D.E. Swaine (ed.). *Avian influenza.* Blackwell Publishing: Oxford, UK, 2008. P. 59-85.
10. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4. Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. P. 1596-1599.

Резюме

2006–2008 жылдары Қазақстанның жабайы құстарынан бөлініп алынған грипп А вирусының H3N6 және H3N8 типтармақтары изоляттарының HA, NP, M және NS гендерін филогенетикалық талдау нәтижелері көltірілген. Қазақстандық изоляттардың бір-бірінен генетикалық айырмашылықтары мен ГенБанк деректер қорындағы грипп А H3 типтартығы вирустарымен туыстыры көрсетілген.

Summary

The results of phylogenetic analysis of HA, NP, M and NS protein genes of influenza A H3N6 and H3N8 subtype viruses separated from wild birds in the territory of Kazakhstan in 2006-2008 are presented. The genetic diversity of Kazakhstan isolates and their relationships to H3 subtype influenza viruses from GenBank international database are shown.